

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004591

International filing date: 09 March 2005 (09.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-66424
Filing date: 09 March 2004 (09.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁 09.3.2005
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 6 6 4 2 4
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

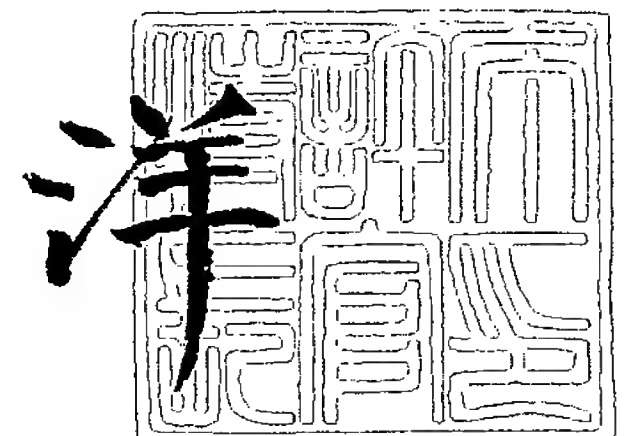
J P 2 0 0 4 - 0 6 6 4 2 4

出 願 人 独立行政法人科学技術振興機構
Applicant(s):

2 0 0 5 年 4 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 NP04070-SH
【提出日】 平成16年 3月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町 4 5 - 1 - 2 0 3
 【氏名】 梅澤 喜夫
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県松戸市稔台 6 1 7 - 1 8
 【氏名】 小澤 岳昌
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100093230
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 西澤 利夫
 【電話番号】 03-5778-0201
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 009911
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316415

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するためのプローブ対であって、

少なくとも、inteinを2分割したうちのC-末端側のポリペプチドと、標識蛋白を2分割したうちのC-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白-C] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブIと

少なくとも、標識蛋白を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドと、inteinを2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白-N/intein-N] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブII

からなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対。

【請求項 2】

生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するためのプローブ対であって、

少なくとも、標識蛋白を2分割したうちのN-末端側のポリペプチドと、inteinを2分割したうちのN-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白-N/intein-N] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブIと

少なくとも、inteinを2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチドと、標識蛋白を2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白-C] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブII

からなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対。

【請求項 3】

inteinは、藍藻由来のDnaEである請求項1または2のいずれかのプローブ対。

【請求項 4】

標識蛋白は、ルシフェラーゼである請求項1または2のいずれかのプローブ対。

【請求項 5】

生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質の核内移行を検出、定量するための方法であって、請求項1ないし4のいずれかのプローブ対におけるプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させ、核内における標識蛋白のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行検出・定量方法。

【請求項 6】

請求項1ないし4のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させる請求項5の検出・定量方法。

【請求項 7】

請求項1ないし4のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させる請求項5の検出・定量方法。

【請求項 8】

蛋白質の核内移行を誘発する物質をスクリーニングするための方法であって、請求項1ないし4のいずれかのプローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行誘発候補物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行誘発物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】

蛋白質の核内移行を阻害する物質をスクリーニングするための方法であって、請求項1な

いし 4 のいずれかのプローブ対におけるプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させ、核内移行阻害候補物質を細胞質に導入した後、さらに蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定し、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較することを特徴とする蛋白質核内移行阻害物質のスクリーニング方法。

【請求項 10】

請求項 1 ないし 4 のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させる請求項 8 または 9 のスクリーニング方法。

【請求項 11】

請求項 1 ないし 4 のいずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させる請求項 8 または 9 のスクリーニング方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】蛋白質核内移行検出用プローブとそれを用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法

【技術分野】

【0001】

この出願の発明は、生物活性物質の作用により生じる蛋白質の核内移行を検出、定量するためのプローブ対に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、生物活性物質の作用により誘発される蛋白質の核内移行を精度高く検出、定量するためのプローブ対と、それを用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法、並びに蛋白質の核内移行を誘発または阻害する物質をスクリーニングするための方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

真核細胞における複雑なシグナル伝達ネットワークは、様々な蛋白質の区画化により制御されている。また、遺伝子発現の度合いや特異性の制御には、細胞内外からの刺激に対する応答としての蛋白質の核原形質輸送が深く関わっている。そして、このような核原形質輸送は、リガンド-レセプター結合、蛋白質リン酸化、蛋白質加水分解などの蛋白質の翻訳後修飾により制御されている。

【0003】

一方、腫瘍細胞内ではしばしば核蛋白質が誤った場所に局在化することが明らかになっており、蛋白質を正しい区画に再輸送させる小分子が盛んに検討されている。同様の誤った蛋白質局在化は、特定の外来性化学物質に曝された細胞においても見られることから、これらの物質が生物に与える影響が懸念される。

【0004】

そこで、核原形質輸送を高速で検出できるスクリーニング方法が確立されれば、抗腫瘍活性を有する物質の発見や、物質毒性試験方法の実現につながり、さらに、核原形質輸送のメカニズムに関する新たな知見が得られると期待される（非特許文献1～4）。

【0005】

単一生細胞内において蛋白質の動態をモニタリングする技術としては、一般に、免疫アッセイによる方法や、遺伝子的に標識された緑色蛍光蛋白質（GFP）を使用する方法が知られている（非特許文献5）。これらの方法は、単一細胞内における対象蛋白質の動態を、空間的および時間的に画像化する上では効果的である。しかし、顕微鏡下で細胞内局在を確認し、定量するためには長時間を要し、さらに、生物内での動態を画像化するためには、オルガネラの抽出や切片化等の煩雑なアッセイ手順を要するという問題があった。

【非特許文献1】Kau, T. R. & Silver, P. A. Drug Discov. Today 8, 78-85 (2003).

【非特許文献2】Kau, T. R. et al. Nat. Rev. Cancer 4, 1-12 (2004).

【非特許文献3】Rudin, M. & Weissleder, R. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 123-131 (2003).

【非特許文献4】Gray, L. E., Jr. et al. Toxicology 181-182, 371-382 (2002).

【非特許文献5】Elion, E. A. Methods Enzymol. 351, 607-622 (2002).

【非特許文献6】Singh, S. M. et al. Curr. Med. Chem. 7, 211-247 (2000).

【非特許文献7】Lorenz, W. W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4438-4442 (1991).

【非特許文献8】Mathews, J. C. et al. Biochemistry 16, 85-91 (1977).

【非特許文献9】Paulmurugan, R. & Gambhir, S. S. Anal. Chem. 75, 1584-1589 (2003).

【非特許文献10】Kaihara, A. et al. Anal. Chem. 75, 4176-4181 (2003).

【非特許文献11】Bhaumik, S. & Gambhir, S. S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 377-382 (2002).

【非特許文献12】Sun, L. et al. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1025-1029 (2001).

001).

【非特許文献 1 3】 Wu, H. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 9226-9231 (1998).

【非特許文献 1 4】 Yang, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 3513-3518 (2003).

【非特許文献 1 5】 Giriat, I. & Muir, T. W. J. Am. Chem. Soc. 125, 7180-7181 (2003).

【非特許文献 1 6】 Chin, H. G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 4510-4515 (2003).

【非特許文献 1 7】 Ozawa, T. et al. Anal. Chem. 73, 5866-5874 (2001).

【非特許文献 1 8】 Ozawa, T. et al. Anal. Chem. 73, 2516-2521 (2001).

【非特許文献 1 9】 Ozawa, T. et al. Nat. Biotechnol. 21, 287-293 (2003).

【非特許文献 2 0】 Paulmurugan, R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 15608-15613 (2002).

【非特許文献 2 1】 Massoud, T. F. & Gambhir, S. S. Genes Dev. 17, 545-580. (2003).

【非特許文献 2 2】 Greer, L. F., 3rd & Szalay, A. A. Luminescence 17, 43-74 (2002).

【非特許文献 2 3】 Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Nat. Med. 9, 123-128 (2003).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、内在性および外来性の物質による蛋白質核内移行を、生細胞や生物個体の局所で検出するための簡便で精度高い方法を提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 7】

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第 1 には、少なくとも、intein を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と、少なくとも、標識蛋白質を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対を提供する。また、この出願の発明は、第 2 には、少なくとも、標識蛋白質を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と、少なくとも、intein を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対を提供する。

【0 0 0 8】

この出願の発明は、第 3 には、intein が藍藻由来の DnaE である蛋白質核内移行検出用プローブ対を、また、第 4 には、標識蛋白質がルシフェラーゼである蛋白質核内移行検出用プローブ対を提供する。

【0 0 0 9】

さらに、この出願の発明は、第 5 には、生物活性物質の作用によって誘発される蛋白質

の核内移行を検出、定量するための方法であって、前記いずれかのプローブ対におけるプローブ I と生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブ II を核内に局在化させ、核内における標識蛋白のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行検出・定量方法を提供する。

【0 0 1 0】

この出願の発明は、第 6 には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブ I と生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブ II を核内に局在化させる蛋白質核内移行検出・定量方法を、第 7 には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I と生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブ II を核内に局在化させる蛋白質核内移行検出・定量方法を提供する。

【0 0 1 1】

さらに、この出願の発明は、第 8 には、蛋白質の核内移行を誘発する物質をスクリーニングするための方法であって、前記いずれかのプローブ対におけるプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させ、核内移行誘発候補物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定することを特徴とする蛋白質核内移行誘発物質のスクリーニング方法を提供する。

【0 0 1 2】

この出願の発明は、また、第 9 には、蛋白質の核内移行を阻害する物質をスクリーニングするための方法であって、前記いずれかのプローブ対におけるプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させ、核内移行阻害候補物質を細胞質に導入した後、さらに蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定し、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較することを特徴とする蛋白質核内移行阻害物質のスクリーニング方法を提供する。

【0 0 1 3】

この出願の発明は、第 1 0 には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させる前記のスクリーニング方法を、そして、第 1 1 には、前記いずれかのプローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I を細胞質に導入し、プローブ II を核内に局在化させる前記のスクリーニング方法をも提供する。

【発明の効果】

【0 0 1 4】

上記第 1 の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対は、少なくとも、intein を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白を 2 分割したうちの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と、少なくとも、標識蛋白を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの残りの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブ II からなる。

【0 0 1 5】

また、同様に、上記第 2 の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対は、少なくとも、標識蛋白を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドと、intein を 2 分割したうちの N-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白-N/intein-N] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブ I と、少なくとも、intein を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドと、標識蛋白を 2 分割したうちの残りの C-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白-C] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなる

プローブIIからなる。

【0016】

これらのプローブ対を細胞に導入した場合、プローブIは細胞質に留まり、プローブIIは核内に局在化される。プローブIにおける蛋白質が生物活性物質を認識、結合し、その作用により細胞質から核内へ移行するとき、プローブIは核内に局在化されたプローブIIと近接する。これにより、プローブIおよびIIにおける2分割されたinteinがスプライシングにより切り出され、標識蛋白が再構築される。したがって、標識蛋白のシグナルを測定することにより、生物活性物質による蛋白質の核内移行を精度高く検出することが可能となる。

【0017】

上記第3の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対では、inteinが藍藻由来のDnaEであることから、inteinが確実に自動的に切り出されるようになる。

【0018】

上記第4の発明の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対では、標識蛋白が発光触媒酵素のルシフェラーゼであることから、プローブIおよびIIの間でスプライシングが起こり、ルシフェラーゼが再構築された場合、活性中心が形成され、ルミノメーターで容易に検出可能な光を発するようになる。

【0019】

上記第5の発明の蛋白質核内移行検出・定量方法では、プローブ対におけるプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させ、核内における標識蛋白のシグナルを測定する。このとき、プローブIは細胞質に留まるが、蛋白質が生物活性物質を認識、結合する場合には、その作用により細胞質から核内へ移行する。すると、プローブIは核内に局在化されたプローブIIと近接し、プローブIおよびIIにおける2分割されたinteinがスプライシングにより切り出され、標識蛋白が再構築される。したがって、標識蛋白のシグナルを測定すれば、生物活性物質による蛋白質の核内移行を精度高く検出することが可能となる。また、蛋白質の核内移行量を定量することも可能となる。

【0020】

上記第6の発明の蛋白質核内移行検出・定量方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させることができる。また、上記第7の発明の蛋白質核内移行検出・定量方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブIと生物活性物質を細胞質中で共存させ、プローブIIを核内に局在化させることができる。

【0021】

上記第8の発明の核内移行誘発物質のスクリーニング方法では、プローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行誘発候補物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定する。候補物質がプローブIにおける蛋白質と結合し、蛋白質の核内移行が誘発されると、プローブIは核内に局在化されたプローブIIと近接し、プローブIおよびIIにおける2分割されたinteinがスプライシングにより切り出され、標識蛋白が再構築される。したがって、標識蛋白のシグナルを測定すれば、該候補物質が該蛋白質に対して、蛋白質核内移行誘発物質として作用するものであるか否かを高速で精度高くスクリーニングできる。

【0022】

上記第9の発明の核内移行阻害物質のスクリーニング方法では、プローブ対におけるプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させ、核内移行阻害候補物質を細胞質に導入した後、蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入して核内における標識蛋白のシグナルを測定する。このとき、候補物質が核内移行阻害物質として作用する場合には、まず、該候補物質が蛋白質と結合する。そのため、蛋白質核内移行誘発物質が蛋白質と結合できなくなり、核内移行が阻害される。したがって、標識蛋白のシグナルが、蛋白質核

内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較して減少する。一方、候補物質が核内移行阻害物質として作用しない場合には、該候補物質は蛋白質と結合しないため、蛋白質核内移行誘発物質を細胞質に導入した際に、蛋白質との結合が起こり、蛋白質が核内に移行する。したがって、標識蛋白のシグナルは、蛋白質核内移行誘発物質のみを細胞質に導入した場合の標識蛋白のシグナルと同等となる。

【0023】

上記第10の発明のスクリーニング方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することにより、プローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させることができる。そして、上記第11の発明のスクリーニング方法では、プローブ対を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブIを細胞質に導入し、プローブIIを核内に局在化させることが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

図1にこの出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対の原理を表す概略模式図を示した。すなわち、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対(1)は、

少なくとも、intein(4)を2分割したうちのC-末端側のポリペプチド(4c)と、標識蛋白(3)を2分割したうちのC-末端側のポリペプチド(3c)が順に連結された[intein-C/標識蛋白-C]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質(2)が連結されてなるプローブI(11)と

少なくとも、標識蛋白(3)を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチド(3n)と、intein(4)を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチド(4n)が順に連結された[標識蛋白-N/intein-N]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナル(5)が連結されてなるプローブII(12)

からなるもの、もしくは、

少なくとも、標識蛋白(3)を2分割したうちのN-末端側のポリペプチド(3n)と、intein(4)を2分割したうちのN-末端側のポリペプチド(4n)が順に連結された[標識蛋白-N/intein-N]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質(2)が連結されてなるプローブI(11)と

少なくとも、intein(4)を2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチド(4c)と、標識蛋白(3)を2分割したうちの残りのC-末端側のポリペプチド(3c)が順に連結された[intein-C/標識蛋白-C]融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナル(5)が連結されてなるプローブII(12)

からなるものである。

【0025】

これらのプローブ対は、細胞内に導入されて使用されるが、そのときプローブI(11)は細胞質に、プローブII(12)は核内に局在化される。プローブI(11)における蛋白質(2)が核内移行誘発物質(6)と結合した場合、プローブI(11)は、細胞質(C)側から核内(N)へ移行し、プローブII(12)と近接する。すると2分割されたintein(4)の二つの部位(4c、4n)が接近して正しく折りたたまれ、これにより、スプライシングが起こり、プローブI(11)およびプローブII(12)からintein(4)が切り出され、2分割された標識蛋白(3)の二つの部位(3c、3n)がペプチド結合により連結され、標識蛋白(3)が再構築される。

【0026】

一方、プローブI(11)における蛋白質(2)が核内移行誘発物質(6)と結合しない場合には、intein(4)のスプライシングが起こらないため、標識蛋白(3)は再構築されない。

【0027】

したがって、この標識蛋白(3)のシグナルを測定することにより、蛋白質(2)の核内移行を検出することができる。

【0028】

以上のとおりの蛋白質核内移行検出用プローブ対において、プローブ I (11) は、[蛋白質 (2) / intein-C (4c) / 標識蛋白-C (3c)] の構成を有する直列融合蛋白質、[intein-C (4c) / 標識蛋白-C (3c) / 蛋白質 (2)] の構成を有する直列融合蛋白質、[蛋白質 (2) / 標識蛋白-N (3n) / intein-N (4n)] の構成を有する直列融合蛋白質、または [標識蛋白-N (3n) / intein-N (4n) / 蛋白質 (2)] の構成を有する直列融合蛋白質のいずれかであるが、このようなプローブ I には、これらの部位以外にも、各部位の間等にリンカー配列 (7) としてポリペプチド等が含まれていてもよい。

【0029】

同様に、プローブ II (12) は、[標識蛋白-N (3n) / intein-N (4n) / 核局在化シグナル (5)] の構成を有する直列融合蛋白質、[核局在化シグナル (5) / 標識蛋白-N (3n) / intein-N (4n)] の構成を有する直列融合蛋白質、[intein-C (4c) / 標識蛋白-C (3c) / 核局在化シグナル (5)] の構成を有する直列融合蛋白質、または、[核局在化シグナル (5) / intein-C (4c) / 標識蛋白-C (3c)] の構成を有する直列融合蛋白質のいずれかであるが、これらの部位以外にも、各部位の間等に、リンカー配列 (7) としてポリペプチド等を含んでいてもよい。

【0030】

この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において、プローブ I (11) に含まれる蛋白質 (2) は、核内移行を検出・定量したいものであればよく、とくに限定されない。例えば、よく知られた核ホルモン受容体であるアンドロゲンレセプター (AR) が例示される。ARは 5α -ジヒドロテストステロン (DHT) に結合することにより細胞質から核内へ移行することが知られている (非特許文献 6)。また、ダイオキシンにより核内移行することが知られるアрил炭化水素受容体 (AhR)、甲状腺ホルモンにより核内移行することが知られる甲状腺ホルモン受容体 (ThR)、コレステロールセンサーとして知られるsterol responsive element binding protein (SREBP)、細胞増殖シグナルに關与するmitogen-activated protein kinase (MAPK)、アポトーシスを誘導するnuclear factor- κ B (NF κ B) 等も例示される。

【0031】

一方、この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において、プローブ II (12) に含まれる核局在化シグナル (5) は、プローブ II (12) が細胞内に導入された際に、プローブ II (12) が核内 (N) に局在化されるようにするためのものであり、その構造や配列はとくに限定されない。具体的には、配列番号 1 のものが例示される。もちろん、これ以外にも、Nucleoplasmin由来のもの (配列番号 2)、HIV-1 Rev由来のもの (配列番号 3) 等の公知の核局在化配列 (NLS) が適用できる。

【0032】

この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において 2 分割されて各々 C-末端側のポリペプチド (3c)、N-末端側のポリペプチド (3n) としてプローブ I (11) およびプローブ II (12) で使用される標識蛋白 (3) は、intein (4) のスプライシングにより直接ペプチド結合し、再構築されて解析可能となるものであれば、どのようなものであってもよい。例えば、蛍光蛋白や発光触媒酵素が好ましく適用される。緑色蛍光蛋白 (GFP) などの蛍光蛋白は、連結されたとき発光し、可視的に解析でき、好ましい。また、ルシフェラーゼ等の発光触媒酵素も連結されて活性中心を形成し、ルミノメーターで容易に検出可能な光を発するため好ましい。とくに、レニラルシフェラーゼ (RLuc) は、分子量が 36-kDa と小さく、活性化に ATP や翻訳後修飾が不要であることから、好ましい (非特許文献 7、8)。分割された RLuc の N-および C-末端が、夫々個々では蛍光を示さず、結合して再び活性を取り戻すようにするためには、活性中心を 2 つに分割するような分け方をするとよい。具体的には、G229 と K230 の間で切断することが好ましいことが報告されている (非特許文献 9、10)。また RLuc の基質である腔腸ルシフェリン (セレンテラジン) が細胞膜を透過し、in vivo での可視化に十分な強度の蛍光を生じることからも、RLuc が好ましいといえる (非特許文献 11)。

【0033】

さらに、この出願の発明の核内移行検出用プローブ対 (1) において、2 分割されて各々 C-末端側のポリペプチド (4c)、N-末端側のポリペプチド (4n) としてプローブ I (11) およびプローブ II (12) で使用される intein (4) としては、種々の生物由来の公知のものが適用できる。プローブ I (11) における蛋白質 (2) と核内移行誘発物質 (6) が相互作用し、プローブ I (11) が核内 (E) に移行してプローブ II (12) と近接することにより intein (4) が自動的に切り出されるためには、intein (4) は、部位特異的エンドヌクレアーゼであることが好ましい。具体的には、酵母 VMA 由来の intein や藍藻由来の DnaE intein が好ましく例示される。中でも藍藻由来の DnaE は、strain PCC6803 の DNA 配列が明らかになっている上、天然の分割 intein であるため、扱い易い。(非特許文献 1 2 ~ 2 0)

さらに、この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) において、intein (4) のスプライシングが有効に起こるためには、プローブ I (11) とプローブ II (12) が核内で近接した際に、プロテインスプライシングに関与する二つの部位が正しく折り畳まれ、かつ、正確に並べられなければならない。したがって、intein としては、生物由来のものをそのまま用いてもよいが、一部のアミノ酸残基を変換したり、削除したり、適当なリンカー配列を導入したりして、スプライシングが起こりやすいように設計されたものを使用してもよい。

【0034】

この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) では、例えば、2 分割された intein (4) の一方のポリペプチド (例えば、C-末端側：4c) が、2 分割された標識蛋白質 (3) の一方のポリペプチド (この場合、3c) に連結された [intein-C (4c) / 標識蛋白質-C (3c)] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質 (2) が連結されてプローブ I (11) を構成する。

【0035】

また、プローブ I で使用されなかった標識蛋白質 (3) のもう一方のポリペプチド (前記の例では、3n) が、プローブ I で使用されなかった intein (4) のもう一方のポリペプチド (この場合、N-末端側：4n) に順に連結された [標識蛋白質-N (3n) / intein-N (4n)] 融合構造の N-末端側または C-末端側に、核局在化シグナル (5) が連結されてプローブ II (12) を構成する。

【0036】

このような蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) において、intein-C (4c) と標識蛋白質-C (3c) や [intein-C (4c) / 標識蛋白質-C (3c)] 融合構造と蛋白質、標識蛋白質-N (3n) と intein-N (4n) や [標識蛋白質-N (3n) / intein-N (4n)] 融合構造と核局在化シグナル (5) は、蛋白質 (2)、核局在化シグナル (5)、各プローブ (11、12) 等の作用に影響を及ぼさなければ、どのような方法で連結されたものであってもよい。例えば、通常用いられる化学的、生物化学的、あるいは、遺伝子工学的手法が適用できる。

【0037】

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質核内移行検出用プローブ対 (1) を用いて蛋白質 (2) の核内移行を検出・定量する方法が提供される。具体的には、前記のプローブ対 (1) におけるプローブ I (11) を細胞質中 (C) で生物活性物質 (6) と共存させ、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させ、核内 (N) における標識蛋白質 (3) のシグナルを測定する。

【0038】

このような蛋白質核内移行の検出・定量方法では、プローブ I (11) は細胞質 (C) に留まり、プローブ II (12) は核局在化シグナル (5) の存在により核内 (N) に局在化するが、蛋白質 (2) が生物活性物質 (6) を認識、結合することによりプローブ I (11) が細胞質 (C) から核内 (N) へ移行する。すると、プローブ I (11) とプローブ II (12) が近接し、これらにおける 2 分割された intein (4) がスプライシングにより切り出されて標識蛋白質 (3) が再構築される。したがって、標識蛋白質 (3) のシグナルを測定すれば、生物

活性物質 (6) による蛋白質 (2) の核内移行を精度高く検出することが可能となる。また、予め標識蛋白 (3) の濃度と標識蛋白 (3) のシグナル強度の関係から検量線を求めれば、蛋白質 (2) の核内移行量を定量することも可能となる。

【0039】

この出願の発明の蛋白質核内移行の検出・定量方法において、プローブ I (11) と生物活性物質 (6) を細胞質 (C) 中で共存させ、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させるためには、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することができる。あるいは、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することにより、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I (11) と生物活性物質 (6) を細胞質中で共存させ、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させることもできる。

【0040】

この出願の発明では、さらに、蛋白質 (2) の核内移行を誘発する物質をスクリーニングするための方法も提供される。すなわち、前記いずれかのプローブ対 (1) におけるプローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させ、核内移行誘発候補物質 (6') を細胞質 (C) に共存させ、その後、核内 (N) における標識蛋白のシグナルを測定することにより核内移行誘発物質をスクリーニングできる。

【0041】

核内移行誘発候補物質 (6') がプローブ I (11) における蛋白質 (2) と相互作用し、この蛋白質 (2) の核内移行が誘発されるとき、プローブ I (11) が細胞質 (C) から核内 (N) へ移行し、核内 (N) に局在化されたプローブ II (12) と近接する。これにより 2 分割されたinteinの一方のポリペプチド (例えば、C-末端側：4c) ともう一方のポリペプチド (4n) が近接し、スプライシングが起こり、次いで 2 分割された標識蛋白 (3c および 3n) がペプチド結合して標識蛋白 (3) が再構築される。したがって、この標識蛋白 (3) のシグナルを測定すれば、核内移行が起こったか否かを確認でき、核内移行を起こした物質を核内移行誘発物質として判定することが可能となる。

【0042】

この出願の発明の核内移行誘発物質のスクリーニング方法において、プローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させるためには、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法が適用される。あるいは、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生すれば、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I (11) を細胞質に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させることができる。

【0043】

さらに、この出願の発明では、蛋白質核内移行阻害物質をスクリーニングする方法が提供される。すなわち、前記いずれかのプローブ対 (1) におけるプローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させ、まず、核内移行阻害候補物質 (6'') を細胞質 (C) に導入する。その後、蛋白質核内移行誘発物質 (6) を細胞質に導入して核内 (N) における標識蛋白のシグナルを測定し、その結果を、蛋白質核内移行誘発物質 (6) のみを細胞質 (C) に導入した場合の標識蛋白のシグナルと比較することにより核内移行阻害物質をスクリーニングできる。

【0044】

核内移行阻害候補物質 (6'') がプローブ I (11) における蛋白質 (2) と蛋白質核内移行誘発物質 (6) の結合を阻害する場合、標識蛋白 (3) のシグナル強度は、核内移行阻害候補物質 (6'') 存在下で、核内移行阻害候補物質 (6'') 非存在下 (すなわち核内移行誘発物質 (6) のみ存在時) に比べて減少する。したがって、このように、標識蛋白 (3) のシグナルを減少させる物質を核内移行阻害物質として判定することができる。

【0045】

このような核内移行阻害物質のスクリーニング方法においても、プローブ I (11) を細胞質 (C) に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させるためには、プローブ対

(1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入する方法が適用される。あるいは、プローブ対 (1) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生すれば、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ I (11) を細胞質に導入し、プローブ II (12) を核内 (N) に局在化させることができる。

【0046】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【実施例】

【0047】

〔手順〕

(1) プラスミドの構築

PCRにより、RLucのN-末端側ドメインをエンコードするcDNA (RLuc-N; 1~229 AA) のC-末端に配列番号4のペプチド (KFAEYC) を、またN-末端に配列番号5に示されるFLAGエピトープ (DYKDDDDK) を導入した。さらに、修飾RLuc-NをエンコードするcDNAを、未変性のHindIIIサイトにより、DnaEのN-末端側ドメインをエンコードするcDNA (DnaE-N; 1~123 AA) に融合した。そして、DnaE-NのC-末端側ドメインをエンコードするcDNAを、NcoIサイトにより、核局在シグナル (配列番号1:NLS; (DPKKKRKV)₃) のcDNAに融合した。

【0048】

PCRにより、RLucのC-末端側ドメインをエンコードするcDNA (RLuc-C; 230~311 AA) のN-末端に配列番号6のペプチド (FNLSH) とユニークな酵素部位MunIを、またC-末端に配列番号7のリンカー (GGGGSG) とユニークな酵素部位NotIを導入した。

【0049】

さらに、PCRにより、ARをエンコードするcDNA (1~918 AA) のN-末端にユニークな酵素部位であるNotIを、C-末端にXhoIを導入した。この修飾RLuc-CをエンコードするcDNAは、MunI部位によりDnaEのC-末端側断片をエンコードするcDNA (DnaE-C; 1~36 AA) に融合し、NotI部位により全長ARをエンコードするcDNAに融合した。

【0050】

これらは、発現ベクターpcDNA 3.1(+) (Invitrogen) の酵素部位BamHIおよびXhoI部位にサブクローニングされた。

【0051】

なお、PCR生成物の忠実度は、BigDye Terminator Cycle Sequencing kitならびに遺伝子分析機ABI Prism310 (PE Biosystems) を用いたシーケンス解析により確認した。

(2) 細胞培養と形質移入

COS-7細胞の培養は、10 %ステロイド除去ウシ胎児血清 (木炭抽出FBS) と1 %ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDMEM中、5 % CO₂、37 °Cの条件下で行った。

【0052】

細胞を12ウェルの培養プレート上に播種した後、lipofectAMINE2000 (Invitrogen) を用いて、前記のプラスミド2 μ gの形質移入を行った。

(3) ウェスタンブロット分析

pcRDn-NLSまたはpcDRc-ARをCOS-7細胞に形質移入し、24時間インキュベートした。細胞をPBS中で1回洗浄し、200 μ lの溶解緩衝液 (1 % ドデシル硫酸ナトリウム、10 % グリセリン、10 % 2-メルカプトエタノール、0.001 % ブロモフェノールブルー、50 mM Tris-HCl、pH 6.8) 中で可溶化した。等量の試料を6 % アクリルアミドゲル中で電気泳動し、ニトロセルロース膜上に転写した後、マウス抗AR抗体 (Santa Cruz) でブロット処理した。ブロットはアルカリホスファターゼ結合二次抗体存在下でインキュベートし、ケミルミネッセンス (New England Biolabs) により可視化した。

(4) 免疫細胞化学手法

COS-7細胞の培養は、顕微鏡ガラススライド上で直接行い (2 \times 10⁵細胞/スライド)、

構築されたプラスミドにより形質移入を行った。形質移入された細胞は、3 %パラホルムアルデヒド溶液で固定した。細胞を0.2%魚皮ゼラチンでブロッキングした後、マウス抗AR抗体 (Santa Cruz) またはマウス抗FLAG抗体 (Sigma) 存在下でインキュベートした。さらに、細胞をCy-5-複合化二次抗体によりインキュベートし、647 nmカットオフフィルタと665 nm I.P. フィルタを装着した共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) を用いて記録した。

(5) in vitroアッセイ (細胞)

プラスミドを用いてCOS-7細胞に形質移入し、12時間インキュベートした。培養液を10 %FBS添加DMEMに置換し、その24時間後に各ウェルにステロイドホルモンまたは合成化学物質を添加した。

【0053】

さらに、COS-7細胞を2時間インキュベートし、細胞を収集して、ルシフェラーゼ活性を、Renilla luciferase assay kit (Promega) により、ルミノメータ (Minilumat LB9506; Berthold GmbH) (積分時間20秒) を用いて評価した。

(6) in vivoイメージング (マウス)

前記(1)で構築したプラスミドpcRDn-NLSおよびpcDRc-ARを、COS-7細胞に個別に形質移入、または同時形質移入した。形質移入後、10% FBS添加DMEM中で12時間にわたりインキュベートし、細胞を収集した。この細胞をPBS中に懸濁し、 1×10^6 個細胞を含む分割量を、麻酔したBALB/cヌードマウス (メス、5週齢、体重約17 g) の背中の異なる4カ所に移植した。

【0054】

移植12時間後、100 μ lのDHT (100 μ g/kg体重) または1.0% (vol/vol) DMSO (溶媒) を腹腔内 (i.p.) 注射した。注射の2時間後、100 μ lのセレンテラジン (2.8 mg/kg体重) をi.p.注射し、2分間隔でマウスのイメージングを行った。

【0055】

RLuc活性に対するDHTの影響を調べるため、2群のヌードマウスの背中に、COS-7細胞 (1×10^6 細胞) を直接注入した。2群のうち最初のマウス群には、100 μ lの1.0 % (vol/vol) DMSO (溶媒) をi.p.注射した。第2群には100 μ lのDHT (100 μ g/kg体重) を注射した。3時間後に100 μ lのセレンテラジン (1.4 mg/kg体重) をi.p.注射し、10分後にマウスのイメージングを行った (n=4)。

【0056】

脳実験のために、前記のプラスミドpcRDn-NLSおよびpcDRc-ARの両方を形質移入したCOS-7細胞 (1×10^5 細胞) を、1 mmの穿刺孔から3 mmの深さでヌードマウスの前脳に移植した。移植直後、4群のうち第1および第2マウス群には、100 μ lの1.0 % DMSOをi.p.注射した。第3および第4マウス群には1.0 % DMSOに溶解した100 μ lのプロシミドンとPCB (10 mg/kg体重) をそれぞれi.p.注射した。

【0057】

注射1時間後に、第2および第3マウス群に1.0% DMSOに溶解した100 μ lのDHT (10 μ g/kg体重) をi.p.注射した。このホルモン刺激の2時間後、10 μ lのセレンテラジン (1.4 mg/kg体重) を側脳室内 (i.c.) 注射し、各マウス群の代表 (n=3) を取り、2分間隔で同時にイメージングを行った。

【0058】

なお、全てのマウスイメージングは冷却CCDカメラ (IVIS100 system、Xenogen) を用いて行った。マウス内への注入細胞より放出されたフォトンを集集し、1分間隔で積算した。画像処理はLIVING IMAGE software (Xenogen) を用いて行った。測定光を定量するため、細胞注入領域上に解析対象領域 (ROI) を描き、平均発光強度 (フォトン/秒/cm²) を計算した。

<実施例 1>

RLucとDnaEのC末端ドメインに連結されたAR (すなわち、プローブ I) が、哺乳動物細胞内の細胞下区画に正しく局在化されることを確認するために、COS-7細胞にpcDRc-AR発

現ベクターを過渡的に形質移入した。

【0059】

DHTの非存在下では、プローブ I は主として細胞質中に存在していた（図 2 a-1）が、DHTを添加したところ、プローブ I が核へ移行した（図 2 a-2）。一方、核局在化シグナル（NLS）を有するRLucドメインとDnaEのN末端ドメイン（すなわち、プローブII）は、DHTの存在・非存在に関わらず、核内に局在化していた（図 2 b）。

【0060】

この結果は、ウエスタンブロット分析の結果とも一致した（図 3）。DHT非存在下では、AR抗体は、プローブ I プラスミドとプローブIIプラスミドを含む細胞粗抽出液において、スプライシングされていない前駆体、すなわちRLuc-CとDnaE-Cに連結された115 kDaのARという特定成分だけを認識した。

【0061】

一方、DHT存在下では、AR抗体は、スプライシングされていない前駆体とともに、135kDaと160kDaのポリペプチド物質を認識した。なお、これらの物質の電気泳動移動度は、スプライシング後の生成物とスプライシング中間体の予想分子量にそれぞれ合致していた。

【0062】

以上の結果から、DHTがARに結合することにより核内移行が起こり、プローブ対におけるスプライシングが起こることが確認された。

<実施例 2>

次にこの出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対を用いてARの核内移行を定量できることを確認するために、in vitro細胞アッセイを用いて、DHTが誘発するプローブ I の核内移行を測定した。

【0063】

COS-7細胞にpcRDn-NLSとpcDRc-ARの両方またはpcRDn-NLS単独を形質移入し、それぞれのウェルに各種濃度のDHTを添加した。細胞を収集し、その溶解物にセレンテラジン溶液を混合した。

【0064】

蛍光測定を行ったところ、DHT濃度の増加に伴い蛍光強度が増大することが確認された。また、その蛍光強度は、バックグラウンドの蛍光と十分区別できるレベルであった（図 4）。

【0065】

以上の結果より、この出願の発明のプローブ対を用いてARの核内移行を定量できることが示された。

<実施例 3>

この出願の発明のプローブ対を用いて、各種の内在性ホルモンや合成化学物質によるARの核内移行を確認した。

【0066】

図 5 より、テストステロンや19-ノルテストステロンなどの内在性アンドロゲンは、 10^{-8} Mから 10^{-5} Mの濃度範囲で大きな蛍光強度を示すことが明らかになった。テストステロンと19-ノルテストステロンの 10^{-6} M濃度における相対強度は、それぞれ同濃度のDHTに対する強度の72%と64%であった（図 5 a）。また、内在性ステロイドホルモンの 17β -エストラジオールとプロゲステロン、合成ステロイドホルモンの酢酸シプロテロン（CPA）、抗アンドロゲン合成化学物質のビンクロゾリンとフルタミドは、同様に蛍光強度を僅かに増加させた（図 5 b）。逆にプロシミドンは試験対象の濃度範囲では、蛍光強度の特異的増加を全く誘発しなかった。

【0067】

反対に、プロシミドンはDHTに誘発される強い蛍光を阻害することが明らかになった（図 5 c）ことから、ARがプロシミドンに結合しても、ARの核内移行が誘発されないことが示された。

【0068】

他の試験物質ではo, p'-DDTが少量のARを核内移行させることが明らかになったが、PCB同属種であるAroclor 1254は、DHTが誘発するARの核内移行を阻害することが確認された。

<実施例 4>

次に、この出願の発明のプローブ対を用いて、化合物の動物細胞小器官における分布を観察できることを確認した。

【0069】

冷却CCDカメラを用いた工学的な生物発光イメージング技術は、操作の容易性、習得時間の短さ、複数マウスを一度に同時測定できる等の利点を有し、高速イメージングを可能とする（非特許文献3、21～23）。

【0070】

生きたマウス内で再構築されたRLucの発する蛍光強度がCCDカメラによる検出に足りる十分な強度を有することを確認するため、100万個の非形質移入COS-7細胞（参考例）、pcRDn-NLSまたはpcDRc-ARを過渡的に形質移入した細胞、もしくはpcRDn-NLSとpcDRc-ARの両者を同時形質移入した細胞を、生きたマウスの背面各箇所真皮内部に注入した。

【0071】

8～35分経過後に冷却CCDにより観察されたマウス画像には、pcRDn-NLSとpcDRc-ARの作成物を含む細胞注入部位だけに顕著な蛍光シグナルが現れた（図6～8）。15分経過時点で2つを同時に形質移入した細胞による蛍光強度は、pcRDn-NLSまたはpcDRc-ARのいずれかを単独で形質移入した細胞による強度の20倍を上回ったことから、生きたマウスの真皮層内部で、RLucの再構築による生体蛍光が精度高く検出できることが確認された。

<実施例 5>

そこで、生きたマウス中でのDHT依存性のAR核内移行を観察するために、2グループの生きたマウスの背面に、プラスミドpcRDn-NLSとpcDRc-ARの両方を同時に過渡的に形質移入したCOS-7細胞を移植し、溶媒（DMSO）またはDHTにより刺激した。

【0072】

一方のマウス群4匹には2時間にわたり1.0 % DMSO（溶媒）による刺激を行い、もう一方のマウス群4匹には同じ時間DHT（100 μ g/kg体重）による刺激を行った。DHT刺激による蛍光強度は、溶媒刺激の場合と比べて3.5倍増加していた（図9、10）。

【0073】

以上の結果から生きたマウスを対象に、DHT非存在下に対するDHT存在下でのARの核内移行度の差を画像化し、定量評価できることが確認された。

<実施例 6>

最後にこの出願の発明のプローブ対を用いて、マウス脳内におけるARの核内移行に対する阻害物質の影響を調べた。

【0074】

pcRDn-NLSとpcDRc-ARを同時に形質移入した細胞をマウス脳内に3mmの深さで注入し、1.0 % DMSOに 10^{-7} M DHT単独、またはそれ以外に各濃度のプロシミドンかPCBを加えた各種のホルモン混合液を腹腔内（i.p.）注入した。

【0075】

脳より得られるフォトン計数値が、DMSO処置を行った対照のフォトン計数値と比較して顕著に増加した（図11、12）ことから、DHTによりARの核内移行が誘発されたことが示唆された。

【0076】

なお、3匹のマウスより得たデータを平均したところ、生物発光の増加量は対照の発光強度に比べて大きかった。DHTに加えてプロシミドンあるいはPCBを同時に注射すると蛍光強度が減少したことから、これらが2時間以内に血液脳関門を通過し、ARの核内移行を阻害できることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0077】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、生細胞や生物での蛋白質の核内移行を非侵襲的にイメージングできる方法が提供される。また、この発明により、蛋白質核内移行の程度を簡便に定量する方法も提供される。この出願の発明のプローブ対を用いた蛋白質核内移行の検出・定量方法は、従来の蛍光技術と異なり、生物発光法によるためバックグラウンドシグナルが無いことから、高精度・高感度での検出が可能である。したがって、治療や毒性化学物質の特定等、薬品開発や創薬のプロセスへの応用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】 この出願の発明の蛋白質核内移行検出用プローブ対の構成および作用を例示した概略模式図である。

【図2】 COS-7細胞にpcDRc-AR発現ベクターを過渡的に形質移入した際の細胞の蛍光顕微鏡像および透過顕微鏡像を示す図である。（a：抗AR抗体；b：抗Flag抗体；1：DHT未添加；2：DHT添加）

【図3】 この出願の発明の実施例において得られたウェスタンブロットを示した図である。（a：COS-7細胞の蛋白質抽出物；b：プローブIおよびIIを同時発現させた細胞（DHT添加）；c：プローブIおよびIIを同時発現させた細胞（DHT未添加））

【図4】 細胞内に添加されたDHT濃度と再構築されたRLucによる蛍光強度の関係を示した図である。

【図5】 各種の内在性ホルモンおよび合成化学物質の濃度と再構築されたRLucによる蛍光強度の関係を示した図である。（a：内在性ホルモン；b：合成化学物質；c：蛋白質核内移行阻害剤）

【図6】 過渡的に形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウス体内における蛋白質核内移行を示すCCD画像である。（1：プローブなし；2：プローブIIのみ発現；3：プローブIのみ発現；4：プローブIおよびIIを発現）

【図7】 過渡的に形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウス体内におけるフォトン値の平均を示した図である。（1：プローブなし；2：プローブIIのみ発現；3：プローブIのみ発現；4：プローブIおよびIIを発現）

【図8】 過渡的に形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウスにセレンテラジンをi.p.注射した後の発光動態の経時変化（1：プローブなし；2：プローブIIのみ発現；3：プローブIのみ発現；4：プローブIおよびIIを発現）

【図9】 プローブIおよびIIを同時形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウスのDHT未注射およびDHT注射後のCCD画像を示した図である。

【図10】 プローブIおよびIIを同時形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウスのDHT未注射およびDHT注射後のフォトン値を示した図である。（4匹の平均値）

【図11】 プローブIおよびIIを同時形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウスにおけるプロシミドンおよびPCBによる蛋白質核内移行阻害を表すCCD画像である。（a：対照（DMSO刺激）；b：DHT；c：DHT + プロシミドン；d：DHT + PCB）

【図12】 プローブIおよびIIを同時形質移入されたCOS-7細胞を移植されたマウスにおけるプロシミドンおよびPCBによる蛋白質核内移行阻害を表すグラフである。（a：対照（DMSO刺激）；b：DHT；c：DHT + プロシミドン；d：DHT + PCB）

【符号の説明】

【0079】

- 1 蛋白質核内移行検出用プローブ対
- 11 プローブI
- 12 プローブII
- 2 蛋白質
- 3 標識蛋白
- 3c 標識蛋白のC-末端側のポリペプチド
- 3n 標識蛋白のN-末端側のポリペプチド
- 4 intein

- 4c inteinのC-末端側のポリペプチド
- 4n inteinのN-末端側のポリペプチド
- 5 核局在化シグナル
- 6 生物活性物質、蛋白質核内移行誘発物質
- 6' 核内移行誘発候補物質
- 6'' 核内移行阻害候補物質
- 7 リンカー
- 8 核膜

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> A Pair of Probes for Detecting Protein Nuclear Translocation

<130> NP04070-SH

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 1

Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5 10 15

Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Xenopus laevis

<400> 2

Lys Arg Pro Ala Ala Ile Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 3

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Gln Arg
1 5 10 15

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized oligopeptide

<400> 4

Lys Phe Ala Glu Tyr Cys
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized oligopeptide

<400> 5

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthesized oligopeptide

<400> 6

Phe Asn Leu Ser His
1 5

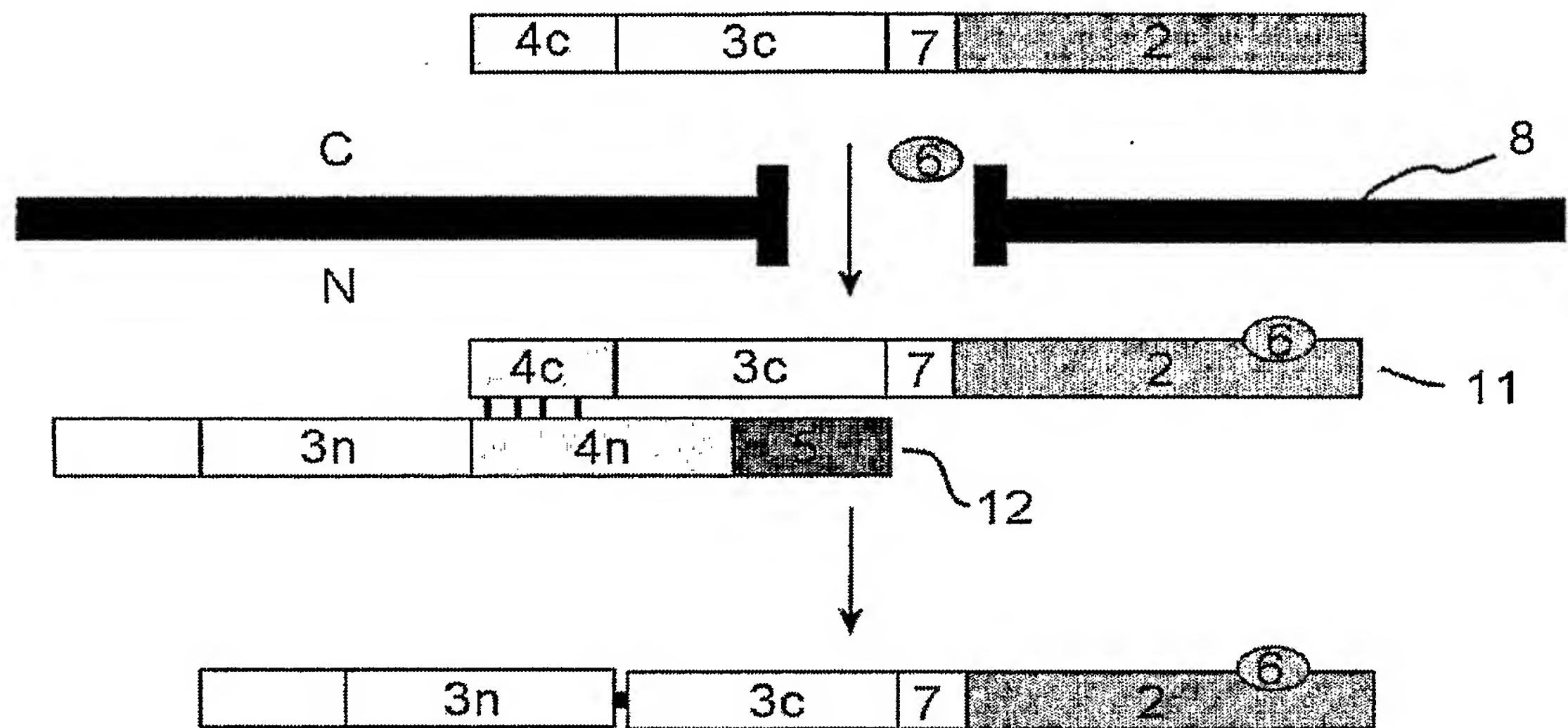
<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> synthesized oligopeptide

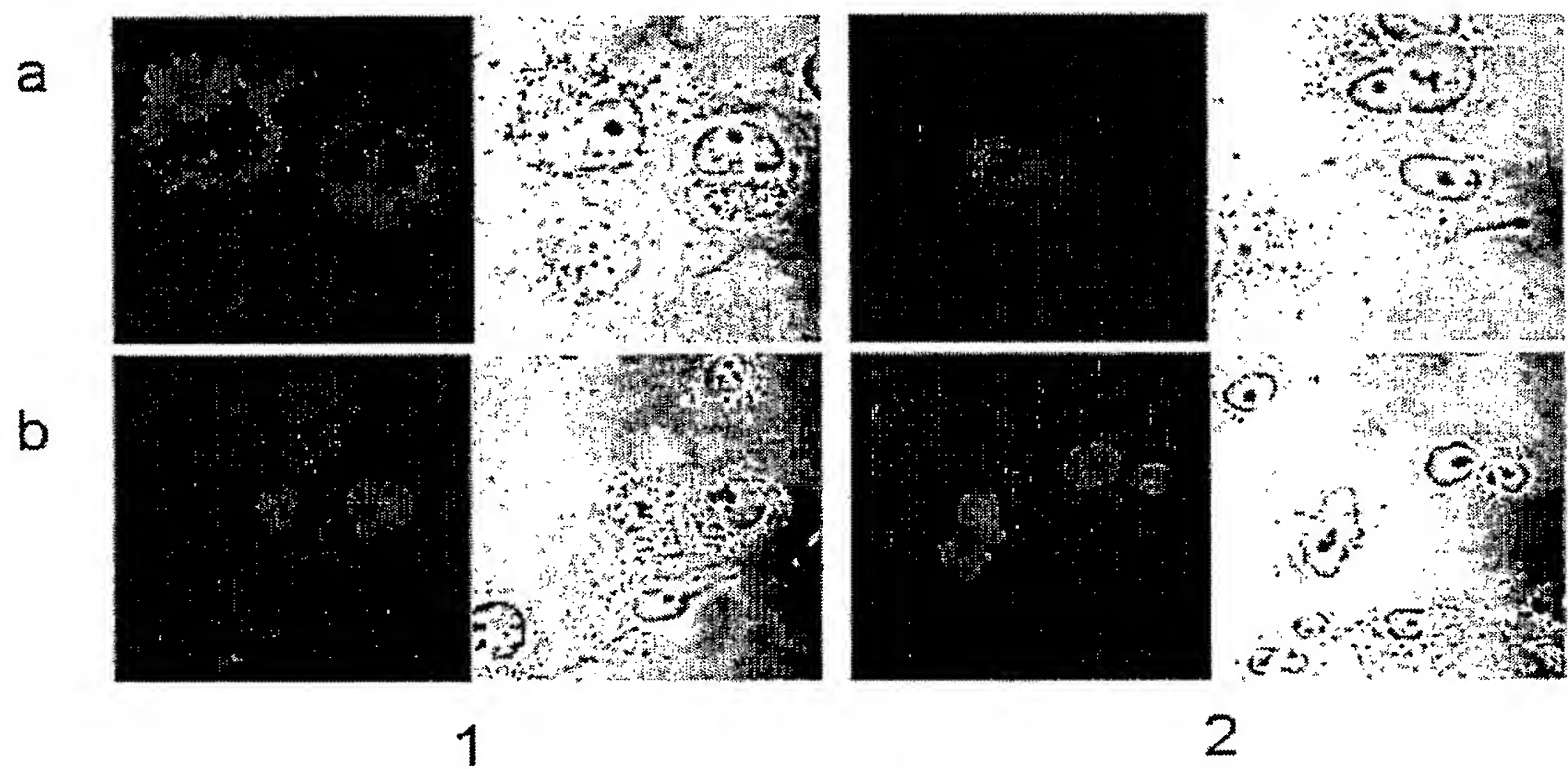
<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

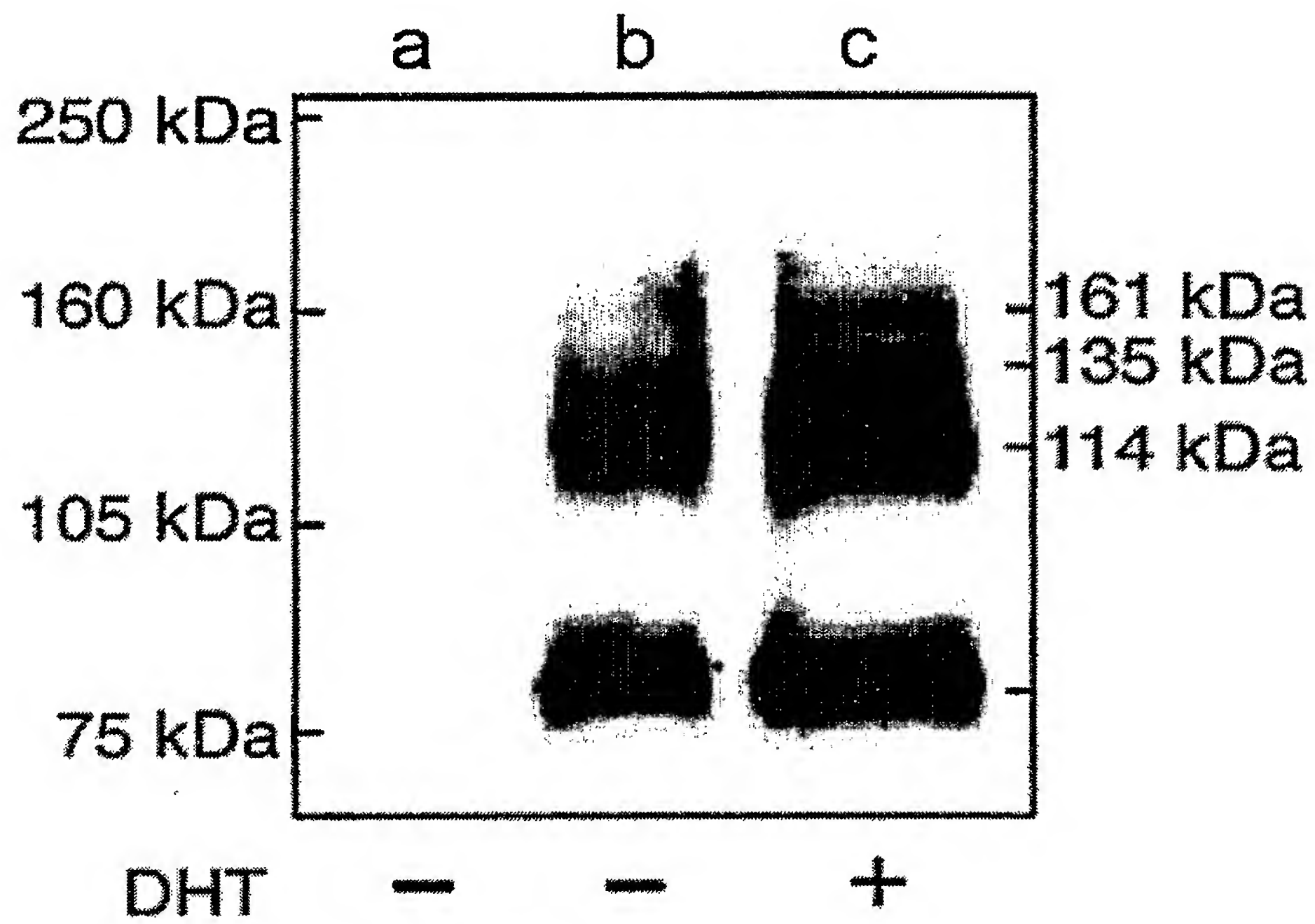
【書類名】 図面
【図 1】



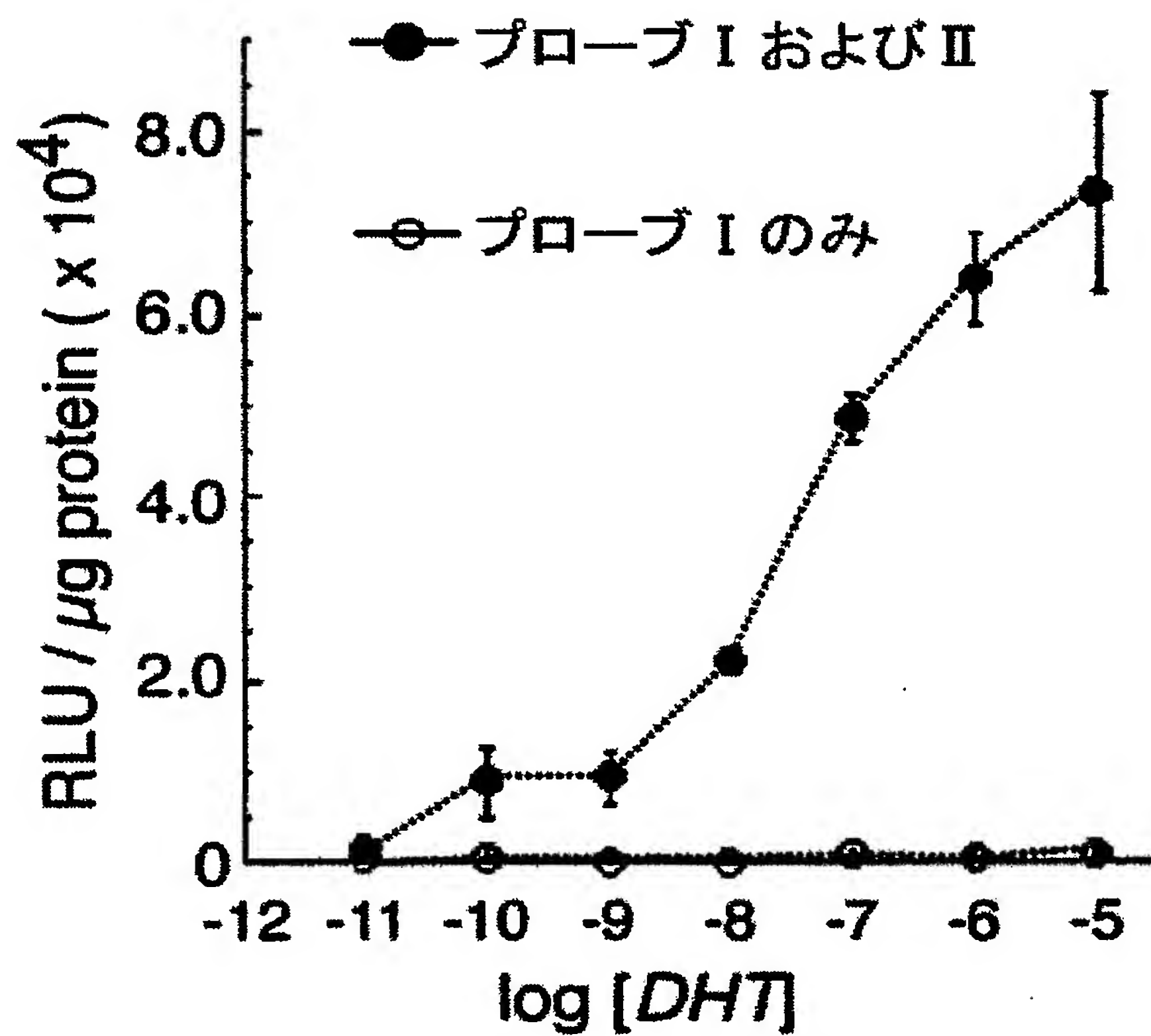
【図 2】



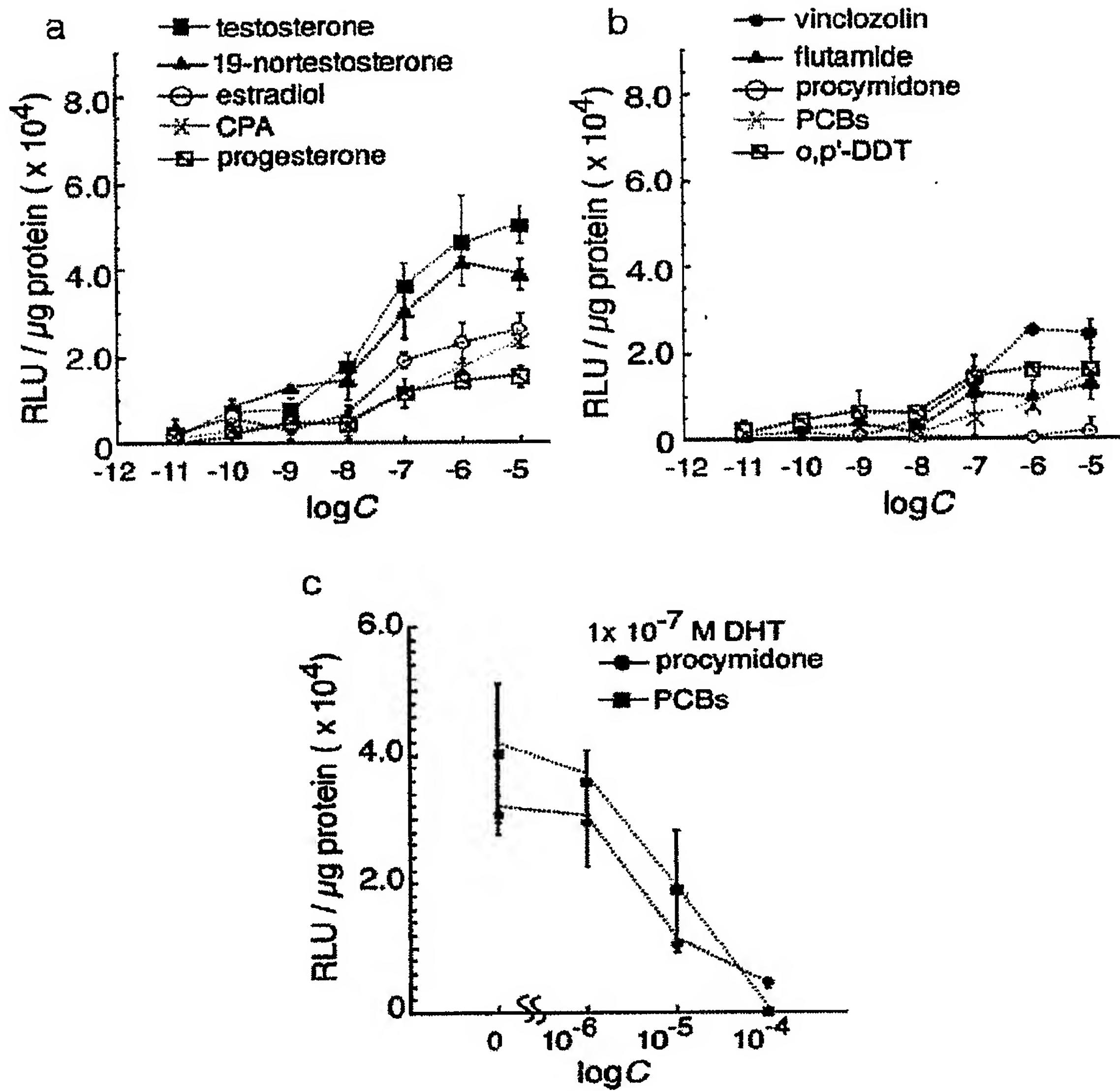
【図 3】



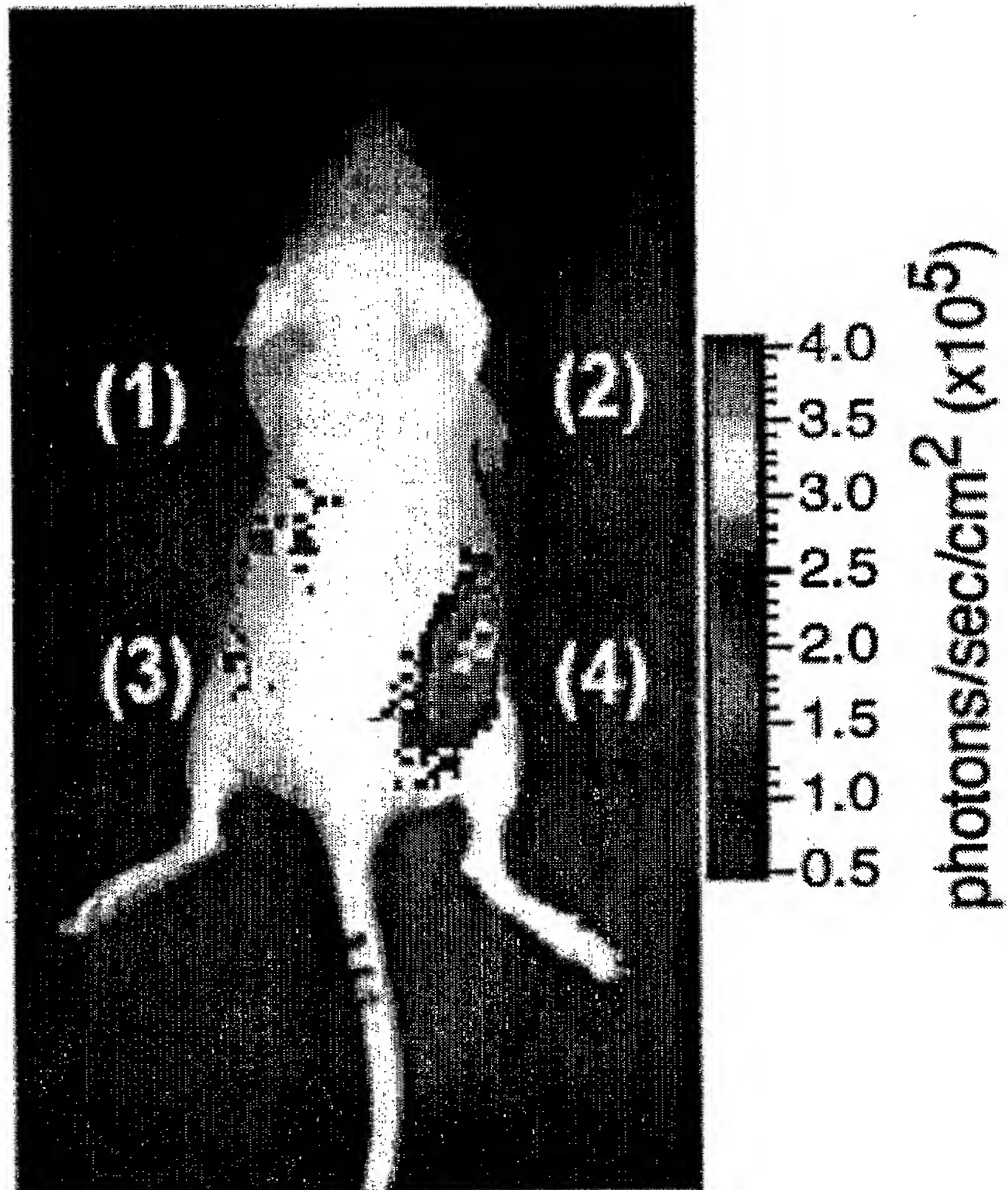
【図 4】



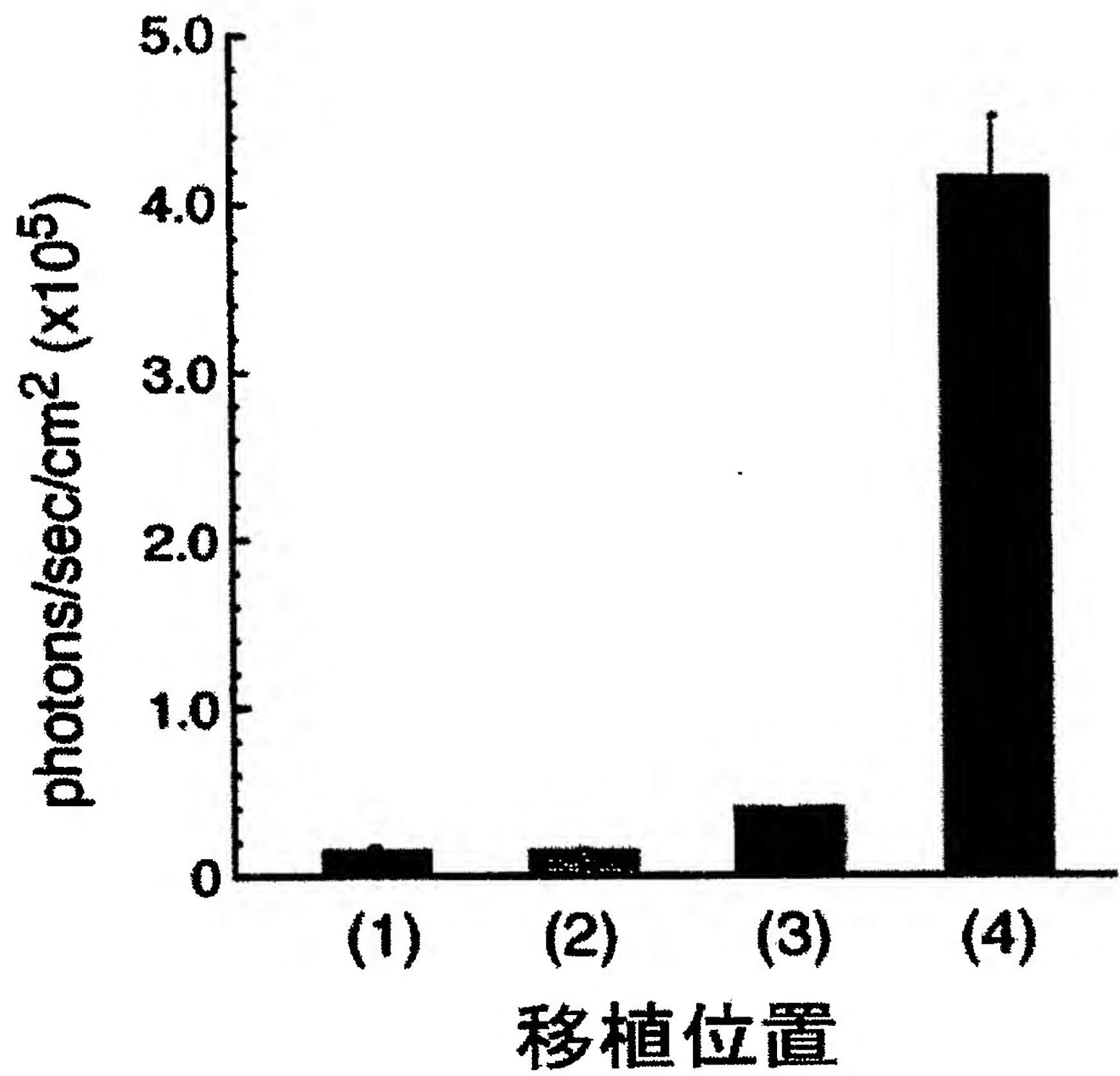
【図 5】



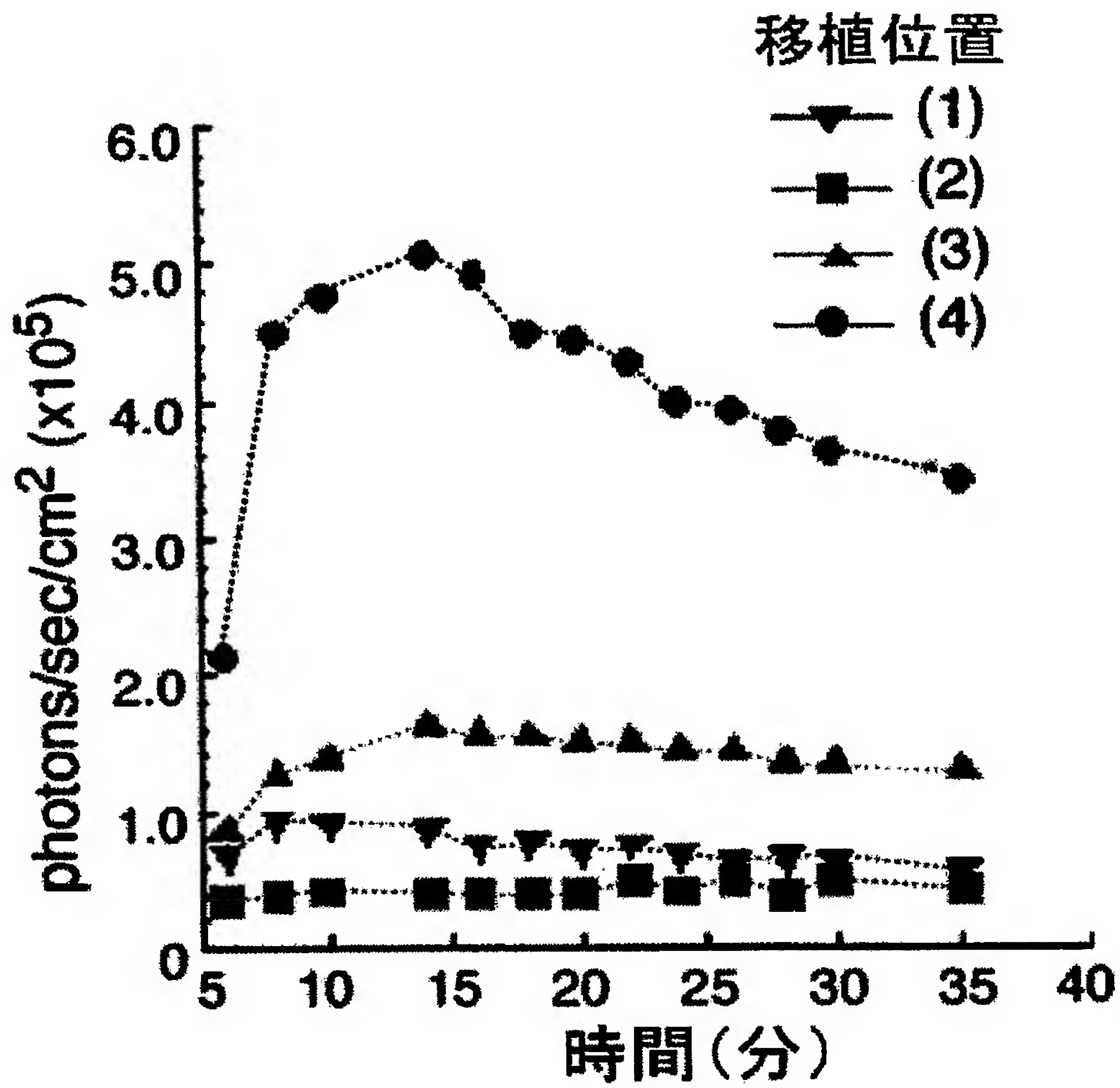
【図 6】



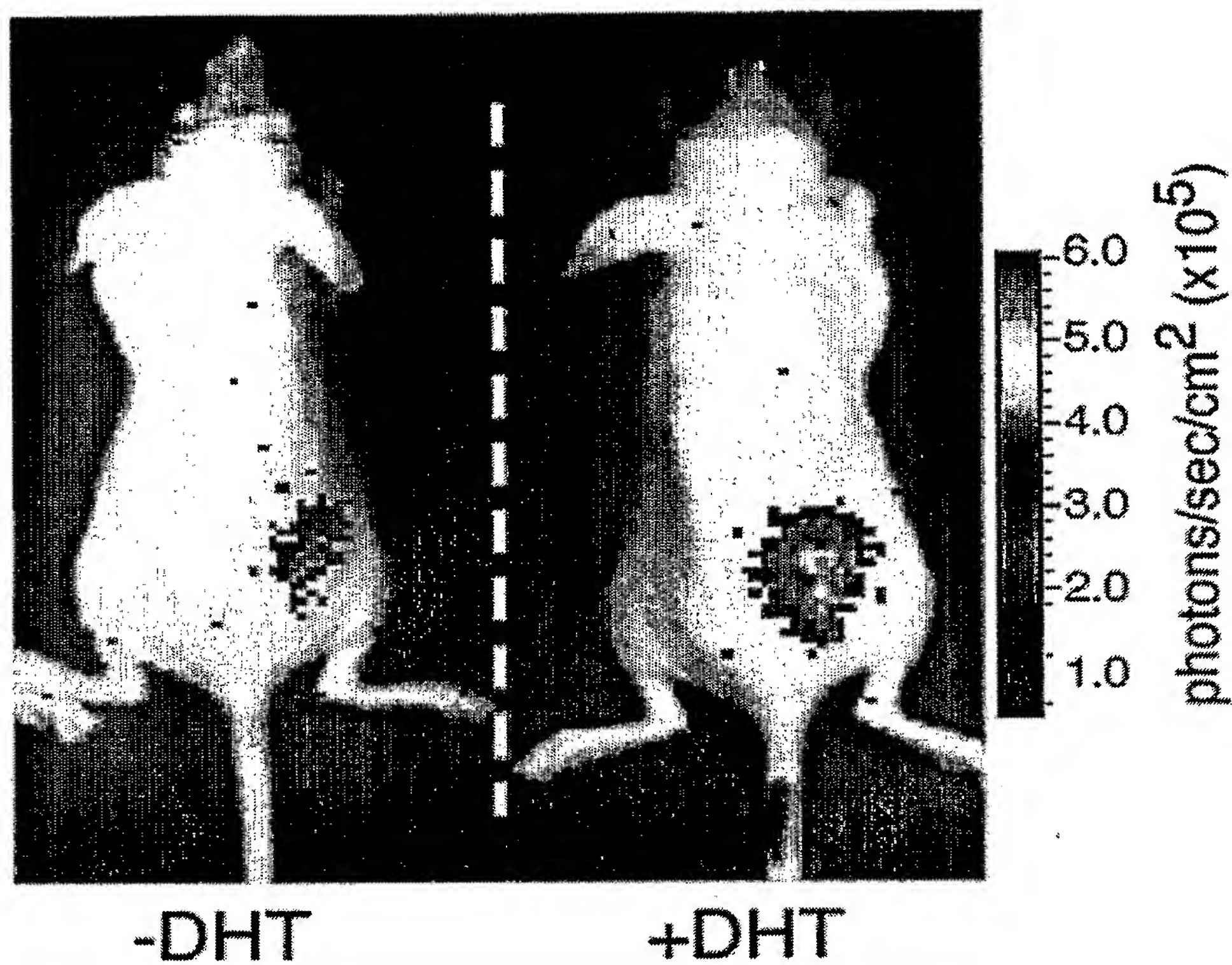
【図 7】



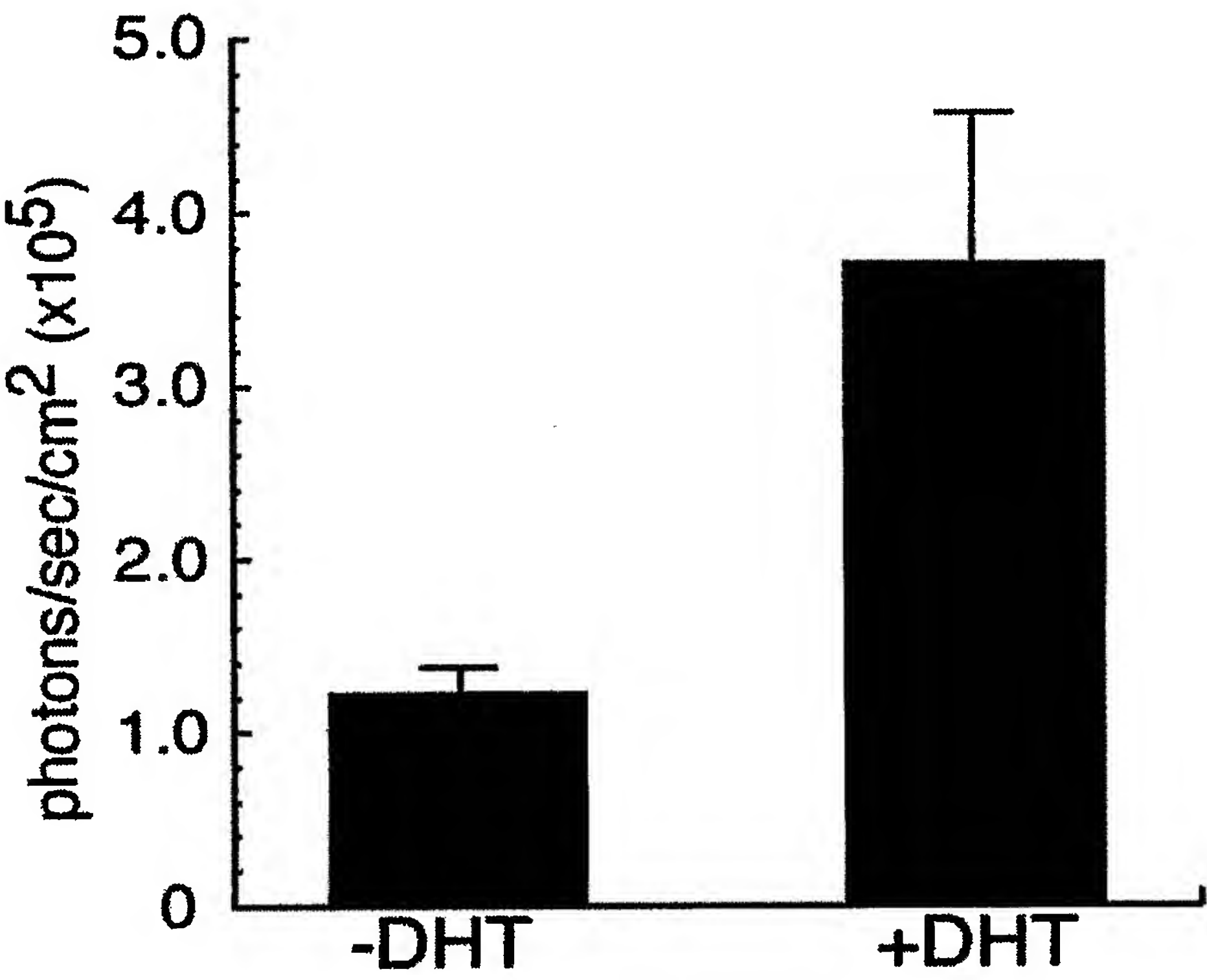
【図 8】



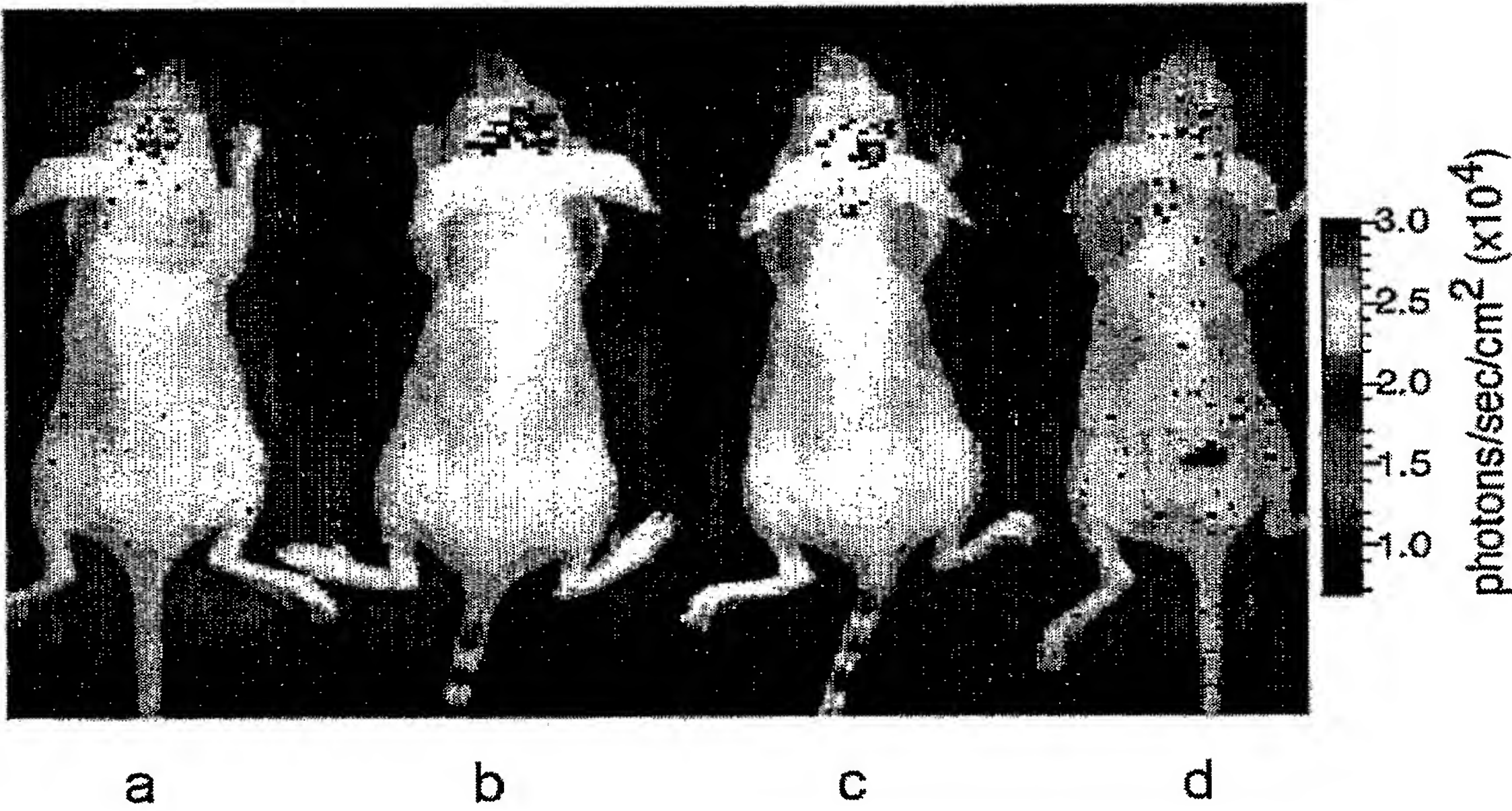
【図 9】



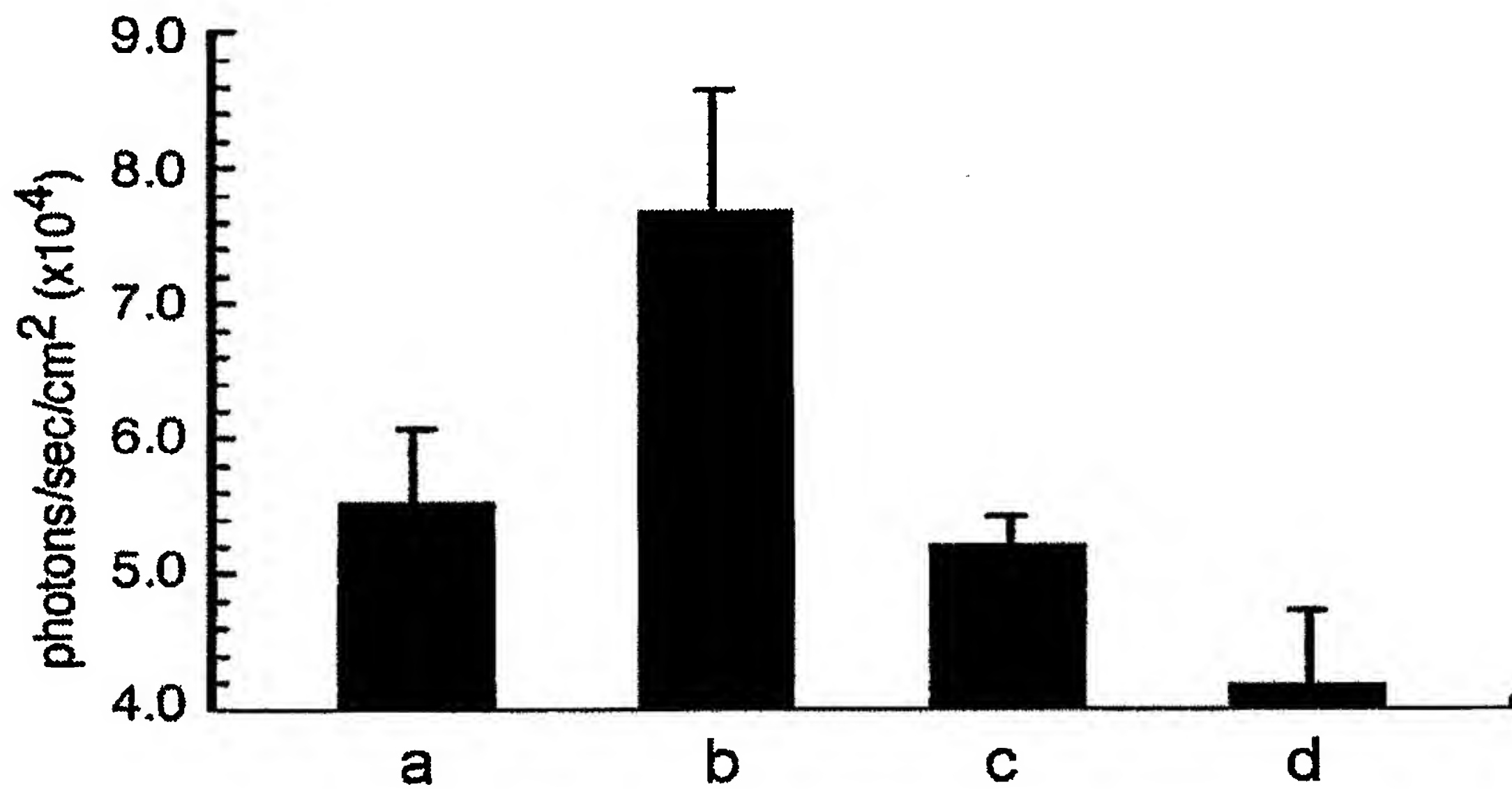
【図 1 0】



【図 1 1】



【図 1 2】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 内在性および外来性の物質による蛋白質核内移行を、生細胞や生物個体の局所で検出するための簡便で精度高い方法を提供する。

【解決手段】 少なくとも、inteinを2分割したうちのC-末端側のポリペプチドと、標識蛋白質を2分割したうちのC-末端側のポリペプチドが順に連結された [intein-C/標識蛋白質-C] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核内移行を検出・定量したい蛋白質が連結されてなるプローブIと、少なくとも、標識蛋白質を2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドと、inteinを2分割したうちの残りのN-末端側のポリペプチドが順に連結された [標識蛋白質-N/intein-N] 融合構造のN-末端側またはC-末端側に、核局在化シグナルが連結されてなるプローブIIからなることを特徴とする蛋白質核内移行検出用プローブ対を用いる。

【選択図】 図1

特願 2 0 0 4 - 0 6 6 4 2 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

- | | |
|----------|-----------------------|
| 1. 変更年月日 | 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人 科学技術振興機構 |
| 2. 変更年月日 | 2 0 0 4 年 4 月 1 日 |
| [変更理由] | 名称変更 |
| 住 所 | 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号 |
| 氏 名 | 独立行政法人科学技術振興機構 |